

## РЕЦЕНЗИЯ

от проф. Албена Йорданова, дб - Софийски университет „Св. Климент Охридски“,  
Медицински факултет, Катедра „Химия и биохимия, физиология и патофизиология“,  
член на научно жури, назначено със заповед №132-ОБ/03.09.2024 г. на Директора на  
Института по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“

доц. Анастас Господинов, дб

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен „доктор“,

в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика;

Професионално направление: 4.3. Биологически науки;

Научна специалност: Молекулярна биология

*Автор: Александър Сергеев Атемин – редовен докторант в Лабораторията по геномна стабилност, Институт по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН*

*Тема на дисертационния труд: Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи*

*Научен ръководител: доц. Марина Неделчева-Велева, Институт по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН*

*Научен консултант: доц. Стойно Стойнов, Институт по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН*

В представения ми за рецензия дисертационен труд на Александър Сергеев Атемин – редовен докторант (отчислен с право на защита) в Лабораторията по геномна стабилност, Институт по Молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – БАН, са изследвани задълбочено и нагледно визуализирани и анализирани динамиката и кинетиката на процеса на навлизане на вируса SARS-CoV-2 в клетките на гостоприемника, както и изследване на динамиката на нивата на различни репликационно-свързани белтъци (RIF1, ORC1, MCM6, Claspin, PCNA) по време на клетъчния цикъл.

Известно е, че COVID-19 е заболяване, предизвикано от нов щам коронавирус, наречен тежък остър респираторен синдром коронавирус 2 (SARS-CoV-2), който поразил лавинообразно човешката популация след месец декември 2019 г. На 11 март 2020 г. Световната здравна организация я определи като пандемия и тази вирусна атака преобърна живота на

всички хора на Земята, като причини смъртта на над 7 милиона души. България се оказва на 87-мо място в света по брой на заразените на 1 млн. жители (над 187 хиляди) и на второ място в света (след Перу) по брой на смъртни случаи на 1 млн. жители (над пет хиляди) – общо 37 965 смъртни случая. На 4 май 2023 г. генералният директор на СЗО обяви, че COVID-19 вече не е извънредна ситуация в областта на общественото здраве от международно значение и подчерта, че въпреки повишения имунитет и по-малкия брой на хоспитализации и смъртни случаи, все още има въпросителни, свързани с начина, по който се инфектират клетките и се развива SARS-CoV-2.

Ето защо и поставената цел в дисертационният труд на Александър Атемин е актуална и не само фундаментална, но и социално значима: да се изследва динамиката на процесите, съпътстващи навлизането на SARS-CoV-2 вирусopodobни частици в клетки-гостоприемници, а в допълнение - да се изследва и динамиката на нивата и разпределението в клетката на различни белтъци, участващи в репликацията на ДНК по време на клетъчния цикъл.

За реализиране на поставените цели са предвидени за изпълнение шест основни задачи, като са използвани и тествани вирусopodobни частици, притежаващи всички структурни белтъци на SARS-CoV-2 и несъществена генетична информация. Известно е, че тези частици навлизат в клетките на гостоприемника по познат механизъм, но не могат да се размножават и да заразяват други клетки. За да се проследи динамиката и кинетиката на процеса на навлизане на вирусните частици в клетката са белязани различни структурни белтъци на SARS-CoV-2 във вирусната мембрана и геном, а в допълнение са установени и изменения на рН във вирусната частица. В допълнение, е изследвано и динамичното поведение на различни репликационно-асоциирани белтъци, като са създадени двойно белязани клетъчни линии *HeLa Kyoto*, които експресират белязани с EGFP-ORC1, MCM6, Claspin, RIF1 или PCNA, заедно с белязан с mCherry PCNA. Чрез високоинформативни микроскопски техники е проследена експресията и разпределението на изследваните белтъци в анализирани клетъчни линии. Нещо повече - след проведен сравнителен анализ на заснетите микроскопски изображения с много висока времева резолюция е установена динамиката на тестваните белтъци през целия клетъчен цикъл.

Дисертационният труд е оформен изключително старателно с някои незначителни технически грешки и логично въвежда читателя от задълбочения и подробен Литературен обзор, през поставените Цели и задачи и Материали и методи към разделите Резултати и Дискусионна част. Дисертацията обхваща 128 страници, съдържа 24 фигури, като на тях са представени многобройни панели или десетки фотографии. Библиографската справка включва 247 актуални литературни източници от реномирани и индексирани научни издания, като преобладаващата част са от последните години.

В **Литературния обзор** е направен задълбочен анализ на разглеждания проблем, като са описани съвременните представи за етимологията на SARS-CoV-2, геномът, структурните и неструктурните белтъци на вируса, както и значението на 9 допълнителни фактора със специфична функция във вирусната репликация. Подробно са описани жизненият цикъл на SARS-CoV-2, прикрепването на вируса към повърхността на клетката гостоприемник чрез S-протеина, осъществяването на мембранна фузия, формирането на репликационно-транскрипционния комплекс на вируса, синтез на вирусната РНК, самосглобяването и освобождаването на формираните SARS-CoV-2 вируси. В **Литературния обзор** е включена актуална информация за съвременните стратегии за лечение на COVID-19, ваксините, използвани срещу COVID-19, както и динамиката и разпределението на различни репликационно-асоциирани белтъци в клетки *HeLa Kyoto*. Единствената ми забележка за представения Литературен обзор е липсата на достатъчно илюстративни фигури, които да представят по-информативно разглежданите процеси.

**Литературният обзор** логично въвежда към изследователските цели, която Александър Атемин си е поставил:

1. Изследване динамиката на процесите, съпътстващи навлизането на SARS-CoV-2 вирусоподобни частици в клетки-гостоприемници.
2. Изследване динамиката на нивата и разпределението в клетката на белтъци, участващи в репликацията на ДНК по време на клетъчния цикъл.

За постигането на тези цели са предвидени за изпълнение следните 6 основни задачи:

- Визуализиране на навлизането и проследяване на движението на SARS-CoV-2 вирусоподобни частици в клетката.
- Измерване на скоростта в 3D на частиците при навлизане в клетката.
- Измерване на промяната на рН по време на навлизането на SARS-CoV-2 вирусоподобни частиците.
- Измерване на динамиката на освобождаване на нуклеокапсида от SARS-CoV-2 вирусоподобните частици при навлизане в клетката.
- Измерване на промените в скоростта, рН, както и динамиката на освобождаването на нуклеокапсида на варианти на SARS-CoV-2 вирусоподобни частици.
- Определяне на нивата и разпределението на ORC1, MCM6, Claspin, RIF1, PCNA по време на клетъчния цикъл на ниво единична клетка.

Разделът **Материали и методи** включва информация за използваните три клетъчни линии VeroE6, U2OS и A549, стъпките при трансфекция с флуоресцентно белязани белтъци,

микроскопия чрез спининг диск конфокална система Andor Dragonfly за продължителен период от време на живи клетки, електронна микроскопия на MLE-12 клетки, информация за синтезата на VLPs, инхибиране на SARS-CoV-2 вирусopodobните частици с рекомбинантно Anti-SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein S1 антитяло, проследяване и анализ на динамиката на вирусopodobните частици, както и анализ на изображенията, получени от микроскопия за продължителен период от време и нормализация на резултатите при проследяване на всички белтъци по време на клетъчния цикъл. При анализа на резултатите са използвани подходящи и актуални софтуерни програми и статистически методи.

Получените *Резултати* и последващата *Дискусия* са представени и анализирани детайлно на 59 страници, като е представен богат и подробен илюстративен материал под формата на микроскопски изображения в реално време, графики, диаграми и схеми. Резултатите са представени в три основни направления: динамика на интернализацията на вирусopodobни частици, изследване на динамиката на нивата на репликационно-свързани белтъци по време на клетъчния цикъл и разработване на база данни с цел визуализация на получените резултати. При изследване на динамиката на интернализацията на SARS-COV-2 вирусopodobни частици са представени оригинални резултати за начина на навлизане на вирусopodobни частици, ролята на динамина при ендоцитозата на вирусopodobни частици, динамиката на ацидификация на вирусopodobни частици, чрез белязване с pHluorin, кинетиката на вирусopodobни частици, при които липсва мястото за разпознаване от протеазата Furin, кинетиката на вирусopodobни частици, съдържащи всички мутации, характерни за Омикрон варианта на SARS-CoV-2, както и скоростта на освобождаване на нуклеокапсида от вирусopodobни частици. При изследване на динамиката на нивата на репликационно-свързани белтъци по време на клетъчния цикъл са представени резултати, които по неоспорим начин доказват способността на докторанта да планира и самостоятелно да провежда молекулярно-биологични експерименти: чрез създаване на двойно белязани клетъчни линии са изследвани нивата на белтъците по време на клетъчния цикъл; измерена е флуоресценцията на протеина PCNA (основен фактор в репликацията и поправката на ДНК) като индикатор за ранна, средна и късна S-фаза, както и динамичните промени в други репликационно-свързани белтъци по време на клетъчния цикъл в единични еукариотни клетки: Rif-1, Orc-1, Mcm-6 и Claspin. В заключение от проведените мащабни изследвания е разработена база данни, за да се визуализират получените резултати. Достъпът до базата данни <https://covidynamics.imb.bas.bg/> е свободен и получените резултати за интернализацията на вирусopodobните частици е достъпна за учени от цял свят, като подробно са описани експерименталните условия, флуоресцентните маркери на клетките и вирусopodobните частици, както и видеозаписи в реално време с и без наличното

проследяване на изследваните частици. Разработена е и база данни за ролята на различни белтъци, участващи в поправката на ДНК: визуализация на динамиката и на натрупването им в местата на ДНК увреждания. Дискусионната част в дисертационния труд е сравнително кратка, но обобщава основните резултати, получени при разработването на софтуера SPARTACUSS за проследяване на SARS-COV-2 вирусopodobни частици, създаването на свободните бази данни <https://covidynamics.imb.bas.bg/> и „DNArepairK: An interactive database for exploring the impact of anticancer drugs onto the dynamics of DNA repair proteins“, изследване на динамиката на навлизане на SARS-CoV-2 вирусopodobни частици в прицелните клетки, както и изследване на динамиката на белтъци, участващи в репликацията на ДНК. Личното ми мнение е, че двата раздела Резултати и Дискусия можеха да бъдат обединени, но и така представени по никакъв начин не поставят под съмнение получените високоинформативни резултати.

Получените резултати при проведените задълбочени изследвания в дисертационния труд са формулирани в 8 основни извода и 5 важни приноса с научно-приложно значение. Резултатите са публикувани в 3 научни статии със забележителен общ импакт фактор 13,457 в периода 2021-2023 година и така са преизпълнени законовите изисквания за придобиване на научната и образователна степен „доктор“. В две от публикациите дисертантът е първи автор, което е доказателство за съществената му роля, подчертания му интерес и ангажираност към изследваната проблематика. Получените резултати са докладвани на 11 Международни и Национални научни форума с доклади и постери, като е впечатляващ фактът, че във всички участия дисертантът е първи автор. Представеният автореферат на дисертационния труд на Александър Атемин е оформен отлично, отговаря напълно на съдържанието на дисертацията и дава пълна информация за проведените експерименти, получените резултати, обсъждане и анализ на изследванията.

В заключение, искам да изкажа положителното си впечатление от това, че е изтъкната нееднократно ролята на сплотения екип на лабораторията по Геномна стабилност в ИМБ-БАН при осъществяване на проведените изследвания, както и приносът и присъствието на незабравимата и обичана от всички нас доц. Марина Неделчева-Велева.

#### **Имам следните въпроси към дисертанта:**

1. Как може да обясните повишената податливост и по-бързата интернализация на вирусopodobните частици в бъбречните VeroE6 клетки, в сравнение с белодробните A549?
2. Как получените от Вас и екипът Ви резултати могат да бъдат приложени в клиничната практика за създаване на терапевтични подходи при лечението на вирусни инфекции, подобни на SARS-COV-2?
3. Какви са бъдещите Ви планове и в каква насока ще продължите изследванията си?

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представеният за обсъждане и защита дисертационен труд е резултат от прецизно осъществено изследване, резултатите от което са със съществена теоретична и приложна значимост. Получените иновативни резултати разкриват детайли за начина на навлизане на SARS-CoV-2 вирусоподобните частици в засегнатите клетки, ролята на микротубулите и динамина в този процес, понижаването на рН след проникването на частиците и др., както и измененията на нивата и разпределението на репликационно-свързаните белтъци RIF<sub>1</sub>, ORC<sub>1</sub>, MCM6, Claspin, PCNA, с което се доказва фината регулация на експресията и локализацията им по време на клетъчния цикъл.

Докторантът Александър Атемин притежава задълбочени теоретични знания и професионални умения по научната специалност Молекулярна биология, като демонстрира качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване. Той е усвоил и може да прилага редица съвременни техники и методи: клетъчно култивиране, трансфекция на клетъчни линии с различни белтъци, инхибиране с различни реагенти, микроскопия на живи обекти за продължителен период от време, разработване на софтуерни решения и бази от данни, проследяване и анализ на обекти, получени след микроскопско наблюдение, което без съмнение го прави млад и обещаващ учен, способен на анализира самостоятелно получените резултати и да ги съпоставя с литературните данни в областта на проведените изследвания.

Въз основа на гореизложеното уверено мога да заявя, че рецензията от мен мащабен дисертационен труд на тема *„Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи“* представлява оригинална научна разработка. Той отговаря на всички условия на Закона за развитие на академичния състав в Република България, Правилника за неговото приложение и Правилника на ИМБ „Акад. Румен Цанев“ - БАН.

**Всичко това ми дава основание напълно убедено да препоръчам на дисертанта Александър Сергеев Атемин да бъде присъдена образователната и научна степен “доктор” в Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика; Професионално направление 4.3. Биологически науки; Научна специалност: Молекулярна биология.**

26.10.2024 г.

Изготвил рецензията:

(проф. Албена Йорданова, дб)